

На правах рукописи

ШАЕВА АЙГУЛЬ ЮСУПОВНА

**ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ
ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

03.01.04 – биохимия

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2011

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Хазипов Нариман Залилович

Научный консультант: доктор биологических наук,
Вафин Рамиль Ришадович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

доктор ветеринарных наук, профессор
Равилов Рустам Хаметович

Ведущая организация: **Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра РАН**

Защита диссертации состоится «22» декабря 2011 г. в « » часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан « » 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Лейкоз крупного рогатого скота – инфекционная болезнь опухолевой природы, этиологическим агентом которой является одноименный вирус (ВЛКРС, англ. *Bovine leukemia virus*, BLV), относящийся к роду *Deltaretrovirus* семейства *Retroviridae* (S.M. Rodriguez et al., 2009).

В структуре инфекционных болезней животных лейкоз крупного рогатого скота в Российской Федерации занимает ведущее место. Он представляет угрозу для генофонда племенного молочного скота, наносит значительный экономический ущерб вследствие падежа животных и недополучения продуктов животноводства (Н.З. Хазипов с соавт., 2008).

Лабораторно-диагностические исследования в системе мониторинга инфицированности стад ВЛКРС являются неразрывным звеном противолейкозных мероприятий.

Вопросы диагностики лейкоза крупного рогатого скота в контексте изучения генетического многообразия его этиологического агента весьма актуальны, учитывая факт невозможности типизации данного вирусного патогена серологическими методами исследования (G. Moratorio et al., 2010).

Ряд разработанных на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей стратегий типизации BLV (H. Fechner et al., 1997; D. Beier et al., 2001; M. Licursi et al., 2002; H. Fechner et al., 1997) имеют определенную идентификационную ценность, однако не способны охарактеризовать весь спектр генетического многообразия ВЛКРС, нежели современный подход к оценке его генотипического разнообразия на основе филогенетического анализа *env*-гена данного возбудителя (S.M. Rodriguez et al., 2009; G. Moratorio et al., 2010).

Цель и задачи исследования. Цель исследования – молекулярно-генетический анализ представителей ВЛКРС на предмет их таксономической классификации в контексте существующих подходов к типизации возбудителя и совершенствование способов генотипической идентификации BLV по локусу *env*-гена.

Для реализации цели решались следующие задачи:

- изучить эпизоотическую ситуацию по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан;
- установить таксономическую принадлежность изолятов ВЛКРС, циркулирующих в хозяйствах Республики Татарстан, в контексте существующих молекулярно-генетических подходов к типизации возбудителя, как на основе ПЦР-ПДРФ, так и филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена провируса BLV;
- классифицировать всех заявленных в GenBank NCBI представителей ВЛКРС в зависимости от выбранной стратегии типизации с дальнейшим определением степени согласованности существующих способов генотипической идентификации BLV;
- разработать схему ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС по локусу *env*-гена возбудителя, согласующуюся с филогенетической классификацией BLV.

Научная новизна.

- Впервые на основании филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена провируса BLV охарактеризован новый, ранее не обоснованный генотип ВЛКРС, обозначенный нами «8-й генотип»,
- Впервые разработана схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV в соответствии с филогенетической классификацией данного возбудителя.

Научная новизна отражена в публикациях ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК и глобальной электронной базе данных GenBank NCBI.

Научно-практическая значимость.

- Результаты молекулярно-генетического анализа представителей ВЛКРС на предмет их таксономической принадлежности существенно повышают уровень знаний о генетическом многообразии BLV и позволяют эффективно использовать полученную информацию в научно-практической деятельности ветеринарной медицины.
- С учетом новых знаний о генетическом многообразии BLV разработана согласующаяся с филогенетической классификацией схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования, позволяющая проводить идентификацию 8-ми генотипов ВЛКРС.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на:

- научнопрактической конференции «Становление и достижения биохимической школы Казанского университета (Казань, 2009 г.);
- Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию кафедры биологической и органической химии Санкт-Петербургской ГАВМ (Санкт-Петербург, 2009 г.);
- VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010 г.);
- научно-практической конференции молодых ученых ФГОУ ВПО «Казанская академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» (Казань, 2010);
- научно-практической конференции «Ветеринарная медицина домашних животных» (Казань, 2010 гг.);
- Международной научно-практической конференции «Инновационные подходы в ветеринарии, биологии и экологии» (Троицк, 2011 г.);
- Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение инновационного развития животноводства» (Казань, 2011 г.);
- Научно-технической конференции «Модернизация АПК на основе инновационных достижений науки и техники» (Казань, 2011 г.).

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 6 публикаций в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, включая 4 депонированные в глобальную базу данных GenBank NCBI публикации нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена выявленных изолятов провируса BLV.

Основные положения, выносимые на защиту.

- На основании результатов серологических и гематологических исследований поголовья крупного рогатого скота на лейкоз в Республике Татарстан установлен эндемический характер распространения данной вирусной инфекции.
- На основании филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена провируса BLV охарактеризован новый, ранее не обоснованный 8-й генотип ВЛКРС, ввиду формирования на выстраиваемых дендрограммах нового автономного генотипического кластера.
- Схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС, разработанная в рамках совершенствования способов генотипической идентификации возбудителя, согласуется с современным подходом к оценке его генотипического разнообразия, основанным на филогенетическом анализе *env*-гена BLV.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 150 страницах компьютерного текста (текстовый редактор «Microsoft Office 2003», стиль «Times New Roman», размер шрифта 14 пт, интервал полуторный) и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, выводы, практические предложения, список использованной литературы (всего 132 источника, в том числе 93 иностранных) и приложения. Диссертация иллюстрирована 29 таблицами, 15 рисунками и 6 схемами. Прилагаются документы, подтверждающие научно-практическую значимость работы.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в 2008-2011 годы на кафедре биологической и неорганической химии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», в ГУ «Республиканская ветеринарная лаборатория РТ» (г. Казань), в лабораториях НПО «СибЭнзим» (г. Новосибирск), а также в сельхозпредприятиях районов Республики Татарстан Российской Федерации.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для эпизоотологического анализа использованы статистические данные ветеринарной отчетности, результаты диагностических исследований на лейкоз крупного рогатого скота (РИД и гематология) ветеринарных лабораторий Республики Татарстан.

Молекулярно-генетическим исследованиям была подвергнута 71 проба крови BLV-позитивных коров сельхозпредприятий 9 районов Республики Татарстан на предмет генотипической идентификации выявленных представителей ВЛКРС на основе ПЦР-ПДРФ- и филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена возбудителя (табл. 1).

Табл. 1. Происследованные образцы провирусной ДНК BLV

№ п.п .	РАЙОН РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН	ПРОИССЛЕДОВАНО	
		ПЦР-ПДРФ- анализ	Секвенирование и филогенетический анализ
1	Арский	7	
2	Дрожжановский	12	2
3	Кайбицкий	7	
4	Лениногорский	10	
5	Мензелинский	6	1
6	Муслимовский	3	
7	Рыбнослободский	8	
8	Спасский	8	1
9	Чистопольский	10	
ВСЕГО ОБРАЗЦОВ		71	4

Экстракцию тотальной ДНК из цельной крови крупного рогатого скота осуществляли с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб Б» согласно инструкции производителя (ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ).

При постановке ПЦР с выделенными образцами провирусной ДНК BLV использовалась модификация «nested» ПЦР с применением «внешних» («env5032»: 5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3' и «env5608»: 5'-AACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3') и «внутренних» («env5099»: 5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3' и «env5521»: 5'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG-3') праймеров, иницирующих на заключительном этапе реакции амплификацию фрагмента *env*-гена ВЛКРС длиной 444 п.н. (D. Beier et al., 2001; M. Licursi et al., 2002; H. Fechner et al. 1997).

Амплификацию локусов ДНК провируса BLV проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия).

ПЦР-продукты, амплифицированные с «внутренними» праймерами «env5099» и «env5521», обрабатывались соответствующими эндонуклеазами рестрикции в зависимости от выбранной стратегии типизации ВЛКРС, основанных на интерпретации ПЦР-ПДРФ-профилей..

ПЦР-ПДРФ-моделирование: NEBcutter v.2.0.

Детекция результатов ПЦР-ПДРФ проведена методом горизонтального электрофореза в 2,5% агарозном геле в буфере TBE (pH 8,0) содержащем этидий бромид с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе ($\lambda=310$ нм). Размеры фрагментов ДНК оценивали по подвижности в сравнении со стандартными ДНК маркерами.

В работе были использованы продукты для молекулярно-биологических исследований производства ООО «СибЭнзим» (Россия).

Секвенирование продуктов амплификации локуса *env*-гена выявленных изолятов провируса ВЛКРС «N10», «N28», «N72» и «N174» выполнено на приборе ABI-300 в лабораториях НПО «СибЭнзим» с использованием праймеров «env5099» и «env5521» в качестве сиквенсных олигонуклеотидов.

GenBank A/N нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена изолятов провируса BLV, выявленных у крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Республики Татарстан:

GenBank A/N: HM102355 – локус *env*-гена изолята провируса BLV «N10», выявленного у крупного рогатого скота в Спасском районе РТ.

GenBank A/N: HM102356 – локус *env*-гена изолята провируса BLV «N28», выявленного у крупного рогатого скота в Мензелинском районе РТ.

GenBank A/N: JF683619 – локус *env*-гена изолята провируса BLV «N72», выявленного у крупного рогатого скота в Дрожжановском районе РТ.

GenBank A/N: JF713455 – локус *env*-гена изолята провируса BLV «N174», выявленного у крупного рогатого скота в Дрожжановском районе РТ.

Изоляты провируса ВЛКРС «N10», «N28», «N72» и «N174» были выравнены по длине 444 и 400 нуклеотидов локуса *env*-гена с соответствующими опубликованными в GenBank последовательностями известных представителей BLV, используя программы BLAST и CLUSTAL W (v. 1.83) в 2-х форматах филогенетического анализа: CLUSTAL и PHYLIP. При построении филогенетических дендрограмм использован алгоритм NJ.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан

3.1.1. Результаты серологических и гематологических исследований крупного рогатого скота за 2006-2010 гг

В 2006-2010 годах диагностические исследования проводились в рамках реализации целевой программы по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота. Обобщенные результаты серологических и гематологических исследований представлены в табл. 2.

Табл. 2. Результаты серологических и гематологических исследований крупного рогатого скота на лейкоз в динамике за 2006 по 2010 гг.

Годы	Исследовано по РИД			Исследовано по гематологии		
	Голов (тыс.)	Выявлено инфицированных		Голов (тыс.)	Выявлено гематологически больных	
		Голов (тыс.)	В %		Голов (тыс.)	В %
2006	510	83,8	16,4	296	7,8	2,6
2007	616	94,5	15,3	279	7,9	2,8
2008	688	117	17,0	279	7,8	2,8
2009	747	132,1	17,7	265	6,5	2,5
2010	750	119,9	16,0	277	6,5	2,3

Так, в 2006 году методом РИД было происследовано 510 тыс. голов крупного рогатого скота, 83,8 тыс. (16,4%) из которых оказались инфицированными; гематологически исследовано 296 тыс. голов, 7,8 тыс. (2,6%) из которых оказались больными (табл. 2).

В 2007 году РИД-исследованиям подверглось 616 тыс. голов крупного рогатого скота, положительные результаты дали 94,5 тыс. (15,3%) животных; гематологическим методом исследовано 279 тыс. голов, гемположительными оказались 7,9 тыс. голов (2,8%) (табл. 2).

К 2010 году количество исследованных голов методом РИД возросло до 750 тыс., 119 тыс. голов (16%) было инфицировано вирусом лейкоза крупного рогатого скота; из 277 тыс. гематологически исследованных животных 6,5 тыс. (2,3%) оказались больными (табл. 2).

3.1.2. Степень инфицированности крупного рогатого скота в разрезе районов Республики Татарстан по состоянию на 2010 год

Серологические исследования на лейкоз крупного рогатого скота проводились во всех районах Республики Татарстан. Получены следующие результаты в разрезе районов по степени инфицированности (табл. 3).

Табл. 3. Процент инфицированности крупного рогатого скота по лейкозу за 2010 год

% положительных животных к общему числу исследованных	Количество районов РТ	Наименование районов РТ	% инфицированных
От 0,1 до 10%	11	Балтасинский	0,1
		Атнинский	0,2
		Тюлячинский	1,5
		Сабинский	2,8
		Сармановский	2,9
		Арский	3,7
		Нижнекамский	4,0
		Ютазинский	5,8
		Высокогорский	7,5
		Зеленодольский	7,8
		Актанышский	9,9
От 10,1 до 20%	12	Тукаевский	10,1
		Нурлатский	10,3
		Агрызский	12,4
		Верхне-Услонский	13,6
		Алькеевский	14,3
		Черемшанский	14,9
		Елабужский	15,1
		Кукморский	16,2
		Менделеевский	16,5
		Новошешминский	17,8
		Алексеевский	19,1
		Мензелинский	19,5

От 20,1 до 30%	15	Чистопольский	20,8
		Бавлинский	21,6
		Муслюмовский	21,6
		Кайбицкий	22,0
		Азнакаевский	22,2
		Тетюшский	23,4
		Аксубаевский	23,5
		Буинский	23,5
		Дрожжановский	24,1
		Лаишевский	25,5
		Рыбно-Слободский	26,1
		Камско-Устьинский	26,6
		Спасский	27,1
		Заинский	29,0
		Апастовский	29,6
от 30,1% и выше	5	Пестречинский	30,3
		Бугульминский	33,2
		Лениногорский	37,2
		Мамадышский	39,5
		Альметьевский	53,7

Так, наименьшая степень инфицированности поголовья вирусом лейкоза крупного рогатого скота (от 0,1 до 10%) отмечалась в 11 районах Республики Татарстан. В 12 районах процент инфицированности составлял от 10,1 до 20%. 15 районов РТ характеризовались степенью зараженности крупного рогатого скота от 20,1 до 30%. Наиболее тяжелая ситуация наблюдалась в 5 районах РТ (Пестречинский, Бугульминский, Лениногорский, Мамадышский и Альметьевский): здесь вирусом лейкоза крупного рогатого скота инфицировано более 30% животных (табл. 3).

Следует констатировать, что эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан характеризуется как эндемичная, как и в целом по Российской Федерации.

3.2. Стратегии типизации ВЛКРС, основанные на интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей

Задачей данного раздела исследования являлось определение таксономической принадлежности представителей ВЛКРС, выявленных в хозяйствах РТ, в контексте молекулярно-генетических аспектов идентификации на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей по 3 стратегиям типизации BLV: по D. Beier et al. (2001), M. Licursi et al. (2002) и H. Fechner et al. (1997).

Процедуре ПДРФ-анализа предшествовал этап амплификации локуса *env*-гена выделенных образцов провирусной ДНК ВЛКРС, для чего использовалась модификация «nested» ПЦР с применением «внешних» («env5032»+«env5608») и «внутренних» («env5099»+«env5521») праймеров, инициирующих на заключительном этапе реакции наработку ПЦР-продукта размером 444 bp.

Результатом эксплуатации подобранных вариантов постановки «nested» ПЦР явилась детекция стабильного ПЦР-сигнала от BLV-позитивных проб, амплифицированные ДНК которых были пригодны для дальнейших молекулярно-генетических исследований (рис. 1).

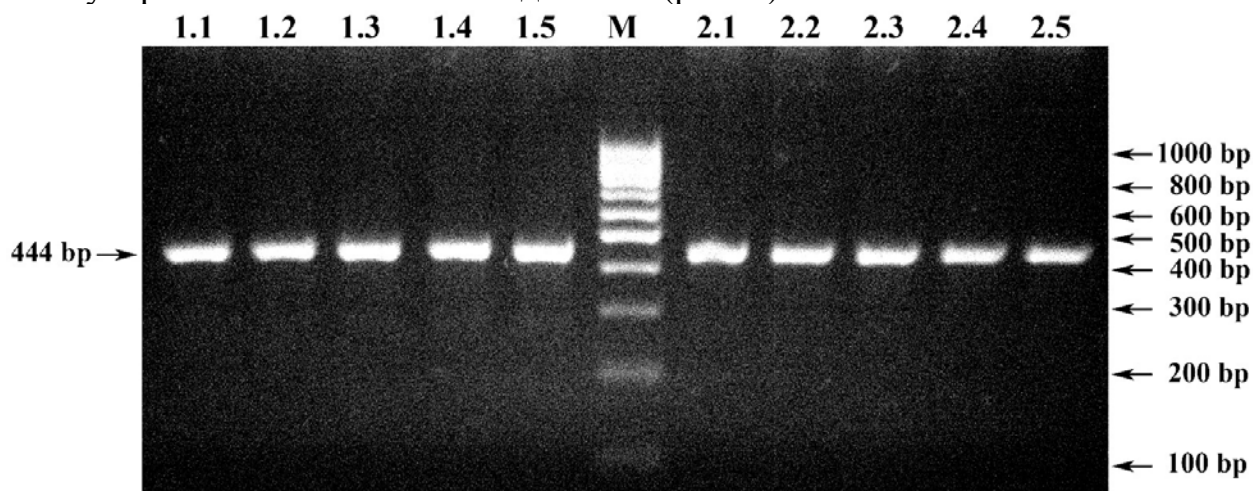


Рис. 1. Электрофореграмма результата «nested» ПЦР с образцами провирусной ДНК изолятов BLV «N10» и «N28» (1-й вариант протокола амплификации локуса *env*-гена ВЛКРС)

Обозначения:

- 1.1-1.5) Образец провирусной ДНК изолята «N10» BLV (ПЦР-продукт: 444 bp).
 М) ДНК-маркеры 100-1000 bp (СибЭнзим).
 2.1-2.5) Образец провирусной ДНК изолята «N28» BLV (ПЦР-продукт: 444 bp).

3.2.1. Интерпретация *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по D. Beier et al. (2001)

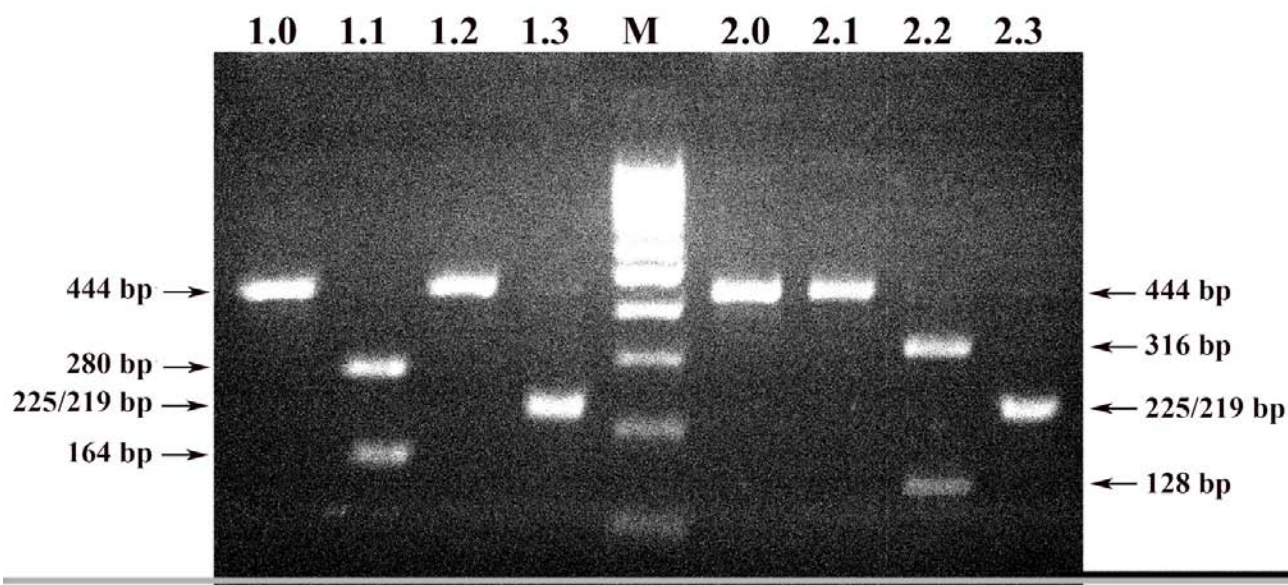
В результате реализации стратегии типизации представителей ВЛКРС на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по D. Beier et al. (2001), установлено, что первоначально изученный нами изолят провируса BLV«N10», выявленный у кр.рог.ск. в Мензелинском районе РТ, относится к Бельгийской подгруппе, а другой изолят «N28», выявленный в Спасском районе РТ, принадлежит Австралийской подгруппе ВЛКРС.

Детальная информация, отражающая характеристику заявленных подгрупп BLV по протоколу Beier et al. (2001), представлена в табл. 4, а результаты ПЦР-ПДРФ-анализа исследованных нами изолятов провируса ВЛКРС «N10» и «N28» отражены на рис. 2.

Два следующих изолята провируса ВЛКРС «N72» и «N174», выявленных у крупного рогатого скота в Дрожжановском районе Республики Татарстан, согласно интерпретации ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по D. Beier et al. (2001), также характеризуются признаком Бельгийской («N72») или Австралийской («N174») подгруппы ВЛКРС, соответственно, формируя на электрофореграмме картину, идентичную результату, отраженному на рис. 2.

Табл. 4. Стратегия типизации BLV по Beier et al. (2001)

ПЦР-ПДРФ-типирование ВЛКРС		ПЦР-продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)		
			<i>PvuII</i>	<i>BamHI</i>	<i>BclI</i> (<i>Ksp22I</i>)
ПОДГРУППА	Бельгийская	444	280/164	444	225/219
	Австралийская	444	444	316/128	225/219
	Японская	444	444	316/128	219/121/104

Рис. 2. Электрофореграмма *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей изолятов вируса BLV «N10» и «N28» (типизация по Beier et al., 2001)

Обозначения: 1.0-1.3) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята вируса BLV «N10»: 1.0) ПЦР-продукт (444 bp); 1.1) *PvuII*-ПДРФ (280/164 bp); 1.2) *BamHI*-ПДРФ (444 bp); 1.3) *Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp). М) ДНК-маркеры 100-1000 bp (СибЭнзим). 2.0-2.3) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята вируса BLV «N28»: 2.0) ПЦР-продукт (444 bp); 2.1) *PvuII*-ПДРФ (444 bp); 2.2) *BamHI*-ПДРФ (316/128 bp); 2.3) *Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp).

Следует отметить, что точные размеры полученных ПЦР-ПДРФ-фрагментов локуса *env*-гена изолятов вируса ВЛКРС «N10», «N28», «N72» и «N174» были установлены в результате секвенирования продуктов ПЦР-амплификации.

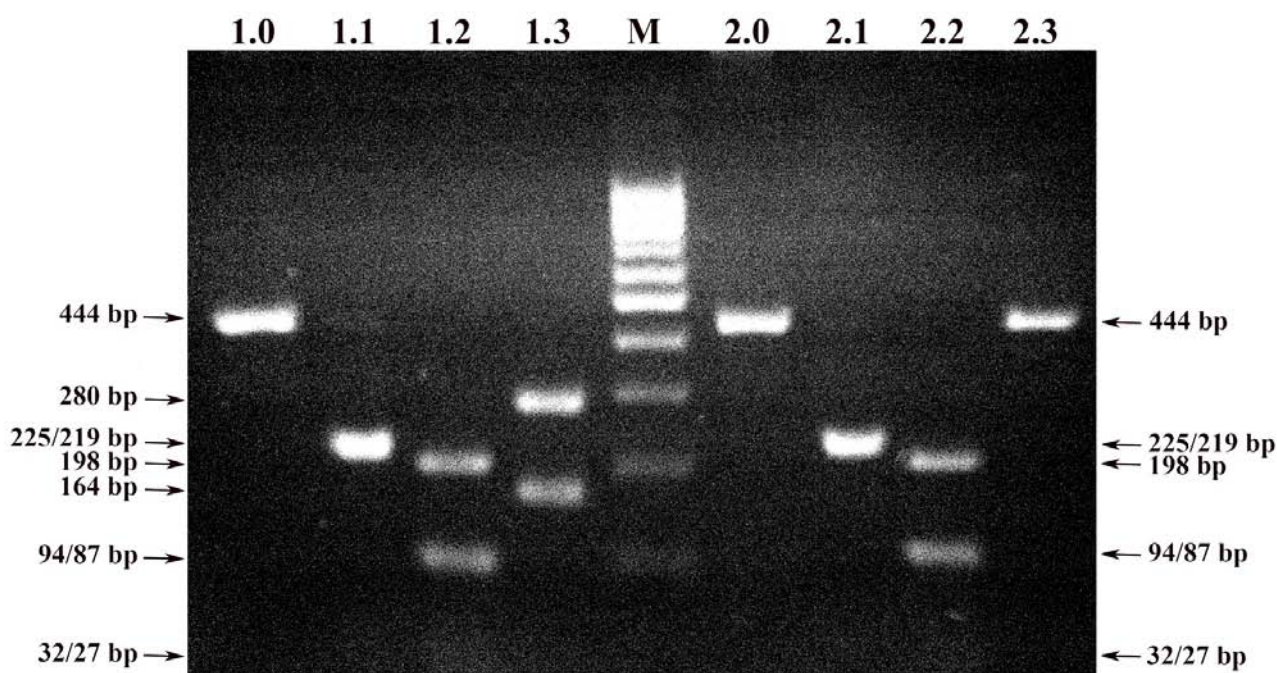
3.2.2. Интерпретация *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по М. Licursi et al. (2002)

В результате реализации стратегии типизации представителей ВЛКРС на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по М. Licursi et al. (2002), установлено, что изолят вируса BLV «N10» относится к 6-му генотипу, а изолят вируса BLV «N28» – к 1-му генотипу ВЛКРС.

Детальная информация, отражающая характеристику заявленных генотипов BLV по протоколу М. Licursi et al. (2002), представлена в табл. 5, а результаты ПЦР-ПДРФ-анализа исследованных нами изолятов вируса ВЛКРС «N10» и «N28» отражены на рис. 3.

Табл. 5. Стратегия типизации BLV по М. Licursi et al. (2002)

ПЦР-ПДРФ- типирование ВЛКРС		ПЦР-продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)		
			<i>BclI</i> (<i>Ksp22I</i>)	<i>HaeIII</i>	<i>PvuII</i>
ГЕНОТИП	1-й	444	225/219	198/94/87/32/27/6	444
	2-й	444	219/121/104	312/94/32/6	444
	3-й	444	219/121/104	285/94/32/27/6	444
	4-й	444	219/121/104	198/94/87/32/27/6	444
	5-й	444	225/219	285/94/32/27/6	444
	6-й	444	225/219	198/94/87/32/27/6	280/164
	?	444	225/219	225/94/87/32/6	444

Рис. 3. Электрофореграмма *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей изолятов провируса BLV «N10» и «N28» (типизация по М. Licursi et al., 2002)

Обозначения: 1.0-1.3) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N10»: 1.0) ПЦР-продукт (444 bp); 1.1) *Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp); 1.2) *HaeIII*-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 1.3) *PvuII*-ПДРФ (280/164 bp). М) ДНК-маркеры 100-1000 bp (СибЭнзим). 2.0-2.3) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N28»: 2.0) ПЦР-продукт (444 bp); 2.1) *Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp); 2.2) *HaeIII*-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 2.3) *PvuII*-ПДРФ (444 bp).

Изолят провируса BLV «N72» согласно интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по М. Licursi et al. (2002), также как и ранее изученный изолят «N10», принадлежит 6-му генотипу ВЛКРС, а другой выявленный нами представитель BLV – изолят «N174» характеризуется признаком нового, ранее не классифицированного генотипа («?») ввиду генерации уникальной комбинации ПДРФ-профилей [*Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp); *HaeIII*-ПДРФ (225/94/87/32/6 bp); *PvuII*-ПДРФ (444 bp)], не свойственной для классифицированных 6-ти генотипов (табл. 5, рис. 4).

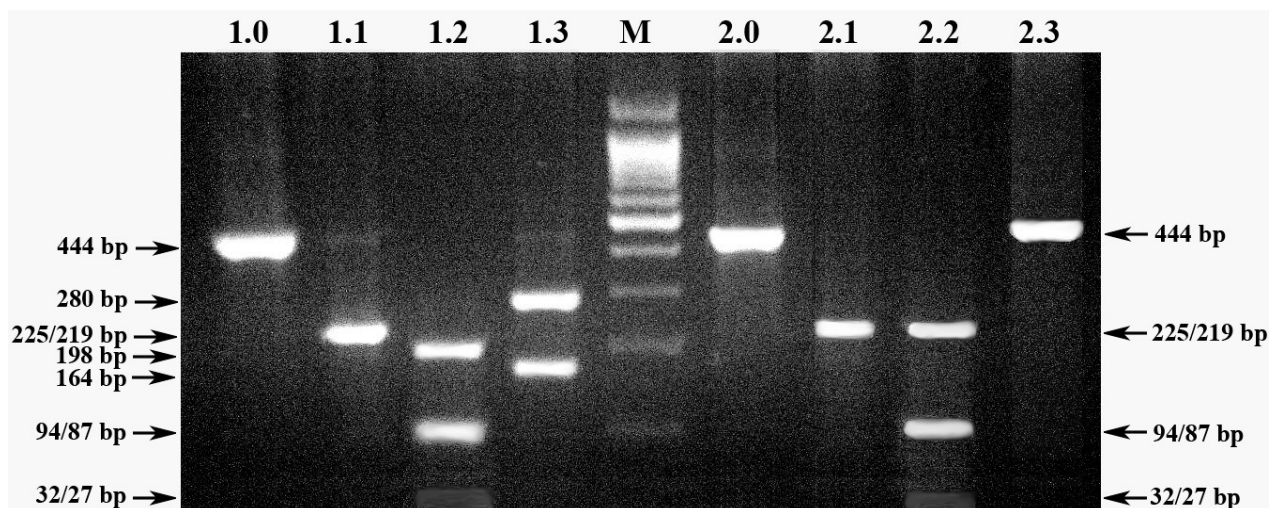


Рис. 4. Электрофореграмма *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей изолятов провируса BLV «N72» и «N174» (типизация по M. Licursi et al., 2002)

Обозначения: 1.0-1.3) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N72»: 1.0) ПЦР-продукт (444 bp); 1.1) *Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp); 1.2) *HaeIII*-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 1.3) *PvuII*-ПДРФ (280/164 bp). М) ДНК-маркеры 100-1000 bp (СибЭнзим). 2.0-2.3) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N174»: 2.0) ПЦР-продукт (444 bp); 2.1) *Ksp22I*-ПДРФ (225/219 bp); 2.2) *HaeIII*-ПДРФ (225/94/87/32/6 bp); 2.3) *PvuII*-ПДРФ (444 bp).

3.2.3. Интерпретация *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по H. Fechner et al. (1997)

В ходе проведения процедуры типизации представителей ВЛКРС на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV по H. Fechner et al. (1997) установлено, что изоляты «N10» и «N72» относятся к вариантной группе «А», а изоляты «N28» и «N174» – к вариантным группам «С» и «Е», соответственно. Детальная информация, отражающая характеристику заявленных вариантных групп BLV по протоколу H. Fechner et al. (1997), представлена в табл. 6, а результаты моделирования *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей изученных изолятов провируса BLV «N10», «N28», «N72» и «N174» отражены на рис. 5.

Табл. 6. Стратегия типизации BLV по H. Fechner et al. (1997)

ПЦР-ПДРФ-типирование ВЛКРС		ПЦР-продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)				
			<i>Bam</i> HI	<i>Bcl</i> II (<i>Ksp</i> 22I)	<i>Bgl</i> II	<i>Hae</i> III	<i>Pvu</i> II
ВАРИАНТНАЯ ГРУППА	A	444	444	225/219	328/116 444	198/94/87/32/27/6	280/164
	B	444	316/128	219/121/104	328/116 444	285/94/32/27/6	444
	C	444	316/128	225/219	328/116	198/94/87/32/27/6 285/94/32/21/6/6	444
					444	285/94/32/27/6	
	D	444	444	225/219	328/116	198/94/87/32/27/6	444
	E	444	316/128	225/219	328/116	225/94/87/32/6	444
	F	444	316/128	225/219	328/116	198/94/87/32/27/6	280/164
	G	444	316/128	225/219	444	312/94/32/6	444

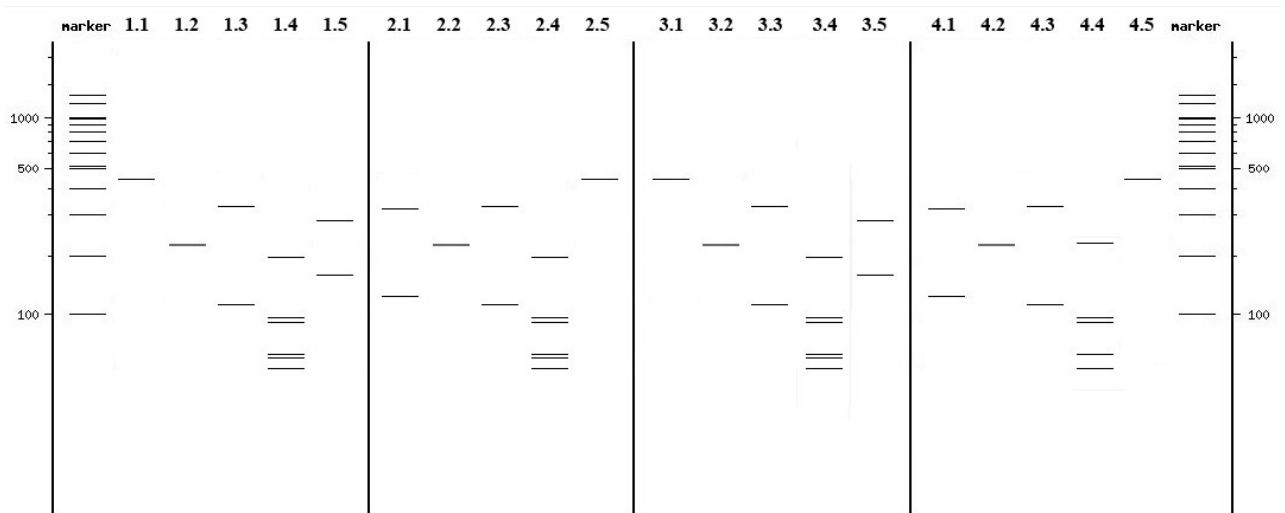


Рис. 5. Моделирование *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей изолятов провируса BLV «N10», «N28», «N72» и «N174» (типизация по Н. Fechner et al., 1997)

Обозначения: 1.1-1.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N10»: 1.1) *Bam*HI-ПДРФ (444 bp); 1.2) *Ksp*22I-ПДРФ (225/219 bp); 1.3) *Bgl*I-ПДРФ (328/116 bp); 1.4) *Hae*III-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 1.5) *Pvu*II-ПДРФ (280/164 bp). 2.1-2.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N28»: 2.1) *Bam*HI-ПДРФ (316/128 bp); 2.2) *Ksp*22I-ПДРФ (225/219 bp); 2.3) *Bgl*I-ПДРФ (328/116 bp); 2.4) *Hae*III-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 2.5) *Pvu*II-ПДРФ (444 bp). 3.1-3.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N72»: 3.1) *Bam*HI-ПДРФ (444 bp); 3.2) *Ksp*22I-ПДРФ (225/219 bp); 3.3) *Bgl*I-ПДРФ (328/116 bp); 3.4) *Hae*III-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 3.5) *Pvu*II-ПДРФ (280/164 bp). 4.1-4.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N174»: 4.1) *Bam*HI-ПДРФ (316/128 bp); 4.2) *Ksp*22I-ПДРФ (225/219 bp); 4.3) *Bgl*I-ПДРФ (328/116 bp); 4.4) *Hae*III-ПДРФ (225/94/87/32/6 bp); 4.5) *Pvu*II-ПДРФ (444 bp).

3.3. Стратегия типизации BLV на основе интерпретации результатов филогенетического анализа локуса *env*-гена возбудителя

Задачей данного раздела исследования являлось определение таксономической принадлежности представителей ВЛКРС, выявленных в хозяйствах РТ, в контексте молекулярно-генетических аспектов идентификации на основе интерпретации результатов филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена провируса BLV.

В результате филогенетического анализа выравненных нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена типовых представителей известных генотипов ВЛКРС установлено, что изолят «N28», выявленный в Спасском районе РТ, принадлежит кластеру 7-го генотипа, а изоляты «N10» и «N72», выявленные соответственно в Мензелинском и Дрожжановском районах РТ, относятся к 4-му генотипу BLV (рис. 6).

Еще один изолят, «N174», выявленный в Дрожжановском районе РТ, характеризуется признаком нового, ранее не обоснованного генотипа ВЛКРС, обозначенного нами «8-й генотип», ввиду формирования на выстраиваемых дендрограммах нового автономного генотипического кластера, в который также входят изученные другими исследователями близкородственные изоляты, выявленные в Украине [«4-1» (GenBank A/N: HM563766); «3-41» (GenBank A/N: HM563767)] и Хорватии [«M1/ELG_Cro/08» (GenBank A/N: GU724606)] (рис. 6).

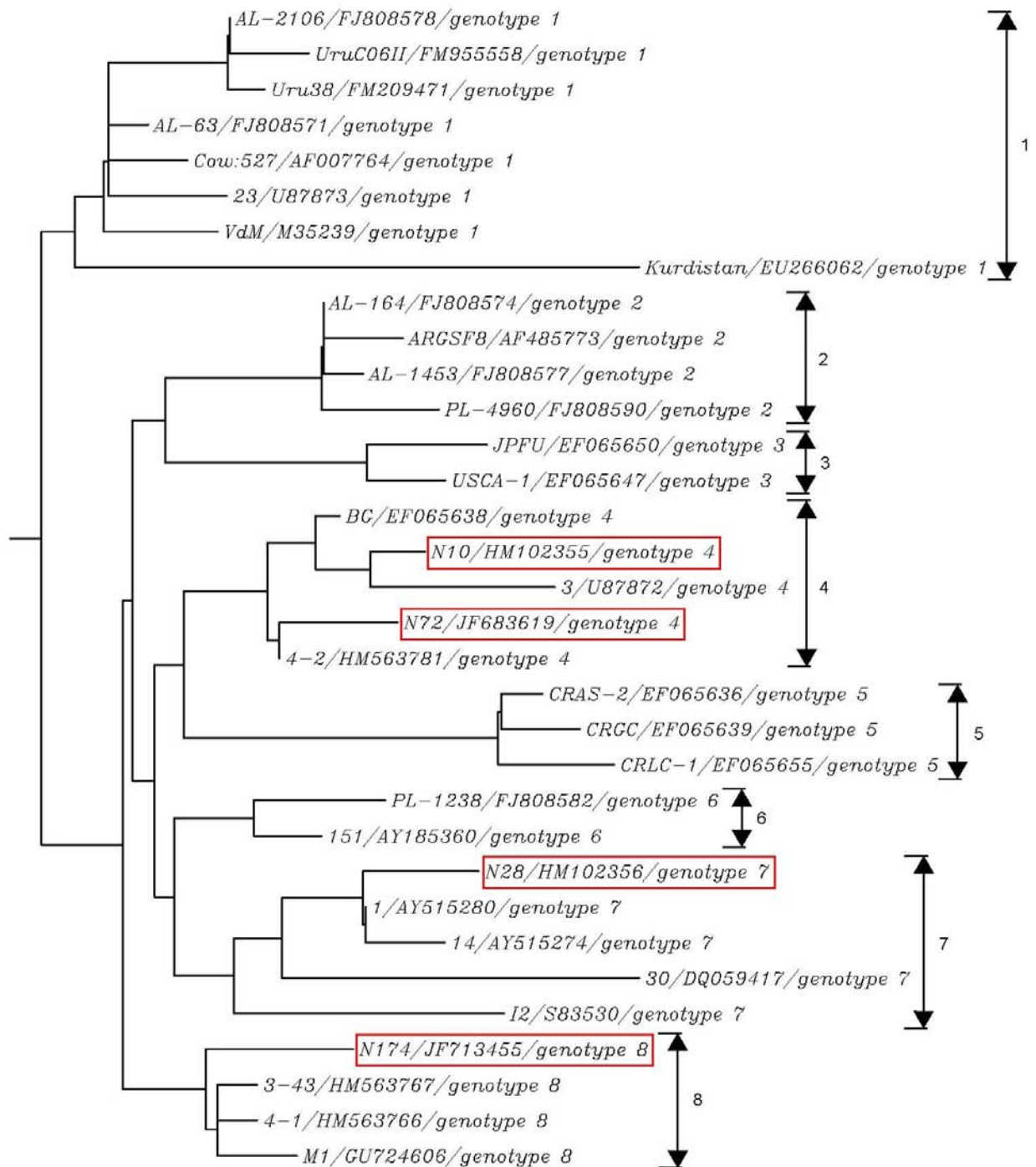


Рис. 6. Дендрограмма типовых представителей известных генотипов BLV (*env*-ген) [CLUSTAL W (v. 1.83); PHYLIP, 444 nt, 33 seq.]

Следует отметить, что предложенная в 2009 году S.M. Rodriguez et al. система классификации BLV на основе филогенетического анализа *env*-гена предусматривает наличие 7 генотипов ВЛКРС. Однако, как в данной (S.M. Rodriguez et al., 2009), так и поздней работе G. Moratorio et al (2010), фактически регламентирующей наличие 7 генотипов, не были проанализированы изоляты охарактеризованного нами нового 8-го генотипа, ввиду депонирования их нуклеотидных последовательностей в базу данных GenBank NCBI позже опубликования указанных статей.

3.4. Классификация заявленных в GenBank NCBI представителей BLV в зависимости от выбранной стратегии типизации

Задачей данного раздела исследования являлась классификация заявленных в GenBank NCBI 210 представителей ВЛКРС в зависимости от выбранной стратегии типизации, как на основе ПЦР-ПДРФ-, так и филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена возбудителя, с дальнейшим определением степени согласованности существующих способов генотипической идентификации BLV.

При сравнительной оценке 210 заявленных в GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена представителей ВЛКРС на предмет их классификации в зависимости от выбранной стратегии идентификации установлено, что известные ранее способы типизации BLV, разработанные на основе ПЦР-ПДРФ-анализа (D. Beier et al., 2001; M. Licursi et al., 2002; H. Fechner et al., 1997), не согласуются с новым подходом к оценке генотипического разнообразия ВЛКРС на основе филогенетического анализа *env*-гена возбудителя. Обобщенные результаты обоснования данной установленной несогласованности отображены в табл. 7.

Табл. 7. Классификация заявленных в GenBank NCBI 210 представителей BLV в зависимости от выбранной стратегии типизации (количественное отношение)

ТИПИЗАЦИЯ ВЛКРС			ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ							
			ГЕНОТИПЫ							
			1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й
ПЦР-ПДРФ-АНАЛИЗ	ПОДГРУППА	Бельгийская				25				
		Австралийская	49		4			8	18	4
		Японская	8					2	1	
		?	42	37		1	10		1	
	ГЕНОТИП	1-й	87			1		7	18	
		2-й								
		3-й	8					2	1	
		4-й								
		5-й	1		4			1		
		6-й		36		25	8			
		?	3	1			2		1	4
	ГРУППА ВАРИАНТНАЯ	A				25				
		B	8					2	1	
		C	48		4			8	18	
		D	39			1				
		E								4
		F		36			8			
		G	1							
		?	3	1			2		1	

Также в ходе сравнительной оценки для каждой из трех заявленных стратегий типизации BLV на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей выявлены уникальные комбинации искомым ПДРФ-профилей, не характерные для классифицированных подгрупп (табл. 8), генотипов (табл. 9) и вариантных

групп (табл. 10) ВЛКРС, и отождествляемые как принадлежащие неклассифицированным таксонам данного возбудителя («?»).

Табл. 8. *Env*-ПЦР-ПДРФ-профили BLV (типизация по D. Beier et al., 2001)

ПЦР-ПДРФ-типирование ВЛКРС		ПЦР-продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)			N
			<i>PvuII</i>	<i>BamHI</i>	<i>BclI</i> (<i>Ksp22I</i>)	
ПОДГРУППА	Бельгийская	444	280/164	444	225/219	25
	Австралийская	444	444	316/128	225/219	83
	Японская	444	444	316/128	219/121/104	11
	?	444	444	444	225/219	41
	?	444	444	316/128	444	2
	?	444	444	316/128	225/191/28	1
	?	444	280/164	316/128	225/219	45
	?	444	280/164	316/128	444	1
	?	444	280/164	316/128	219/189/36	1

Табл. 9. *Env*-ПЦР-ПДРФ-профили BLV (типизация по M. Licursi et al., 2002)

ПЦР-ПДРФ- типирование ВЛКРС		ПЦР-продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)			N
			<i>BclI</i> (<i>Ksp22I</i>)	<i>HaeIII</i>	<i>PvuII</i>	
ГЕНОТИП	1-й	444	225/219	198/94/87/32/27/6	444	113
	2-й	444	219/121/104	312/94/32/6	444	
	3-й	444	219/121/104	285/94/32/27/6	444	11
	4-й	444	219/121/104	198/94/87/32/27/6	444	
	5-й	444	225/219	285/94/32/27/6	444	6
	6-й	444	225/219	198/94/87/32/27/6	280/164	69
	?	444	444	198/94/87/32/27/6	444	1
	?	444	225/191/28	198/119/94/27/6	444	1
	?	444	225/219	312/94/32/6	444	1
	?	444	444	198/94/87/32/27/6	280.164	1
	?	444	219/189/36	198/94/87/32/27/6	280/164	1
	?	444	225/219	285/94/32/27/6	280/164	1
	?	444	444	198/87/49/45/32/27/6	444	1
	?	444	225/219	225/94/87/32/6	444	4

Табл. 10. *Env*-ПЦР-ПДРФ-профили BLV (типизация по H. Fechner et al., 1997)

ПЦР-ПДРФ-типирование ВЛКРС		ПЦР-продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)				N	
			<i>Bam</i> HI	<i>Bcl</i> II (<i>Ksp</i> 22I)	<i>Bgl</i> II	<i>Hae</i> III		<i>Pvu</i> II
ВАРИАНТНАЯ ГРУППА	A	444	444	225/219	328/116 444	198/94/87/32/27/6	280/164	25
	B	444	316/128	219/121/104	328/116 444	285/94/32/27/6	444	11
	C	444	316/128	225/219	328/116	198/94/87/32/27/6	444	78
						285/94/32/21/6/6		
					444	285/94/32/27/6		
	D	444	444	225/219	328/116	198/94/87/32/27/6	444	40
	E	444	316/128	225/219	328/116	225/94/8732/6	444	4
	F	444	316/128	225/219	328/116	198/94/87/32/27/6	280/164	44
	G	444	316/128	225/219	444	312/94/32/6	444	1
	?	444	316/128	444	328/116	198/94/87/32/27/6	444	1
	?	444	316/128	225/191/28	328/116	198/119/94/27/6	444	1
	?	444	444	225/219	444	285/94/32/27/6	444	1
	?	444	316/128	444	328/116	198/94/87/32/27/6	280/164	1
	?	444	316/128	219/189/36	328/116	198/94/87/32/27/6	280/164	1
	?	444	316/128	225/219	444	285/94/32/27/6	280/164	1
?	444	316/128	444	328/116	198/87/49/45/32/27/6	444	1	

N – количество проанализированных представителей BLV с соответствующим ПЦР-ПДРФ-профилем, чьи нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена депонированы в базу данных GenBank (по состоянию на апрель 2011 г). «?» - неклассифицированный таксон BLV.

3.5. Совершенствование способов генотипической идентификации BLV

по локусу *env*-гена возбудителя

Задачей данного раздела исследования являлась разработка схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС, согласующейся с филогенетической классификацией, предложенной S.M. Rodriguez (2009), для чего на первом временном этапе был проведен скрининг известных эндонуклеаз рестрикции для формирования оптимального протокола идентификации путем моделирования ПЦР-ПДРФ-профилей нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена представителей известных генотипов BLV, депонированных в базу данных GenBank по состоянию на июнь 2010 г.

Следует отметить, что количество проанализированных представителей BLV, чьи нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена были депонированы в базу данных GenBank, по состоянию на июнь 2010 г составляло 184, в число которых входили и 2 выявленных нами изолята вируса ВЛКРС – «N10» (GenBank A/N: HM102355) и «N28» (GenBank A/N: HM102356).

По результатам тотальной оценки рестрикционных картировок локуса *env*-гена известных представителей BLV, в рамках разработки схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования, согласующейся с филогенетической классификацией, нами были подобраны условия идентификации генотипов ВЛКРС по 5 эндонуклеазам рестрикции: *Bam*HI, *Pvu*II, *Dde*I, *Ssp*I и *Hph*I (*Asu*HPI).

Информация с интерпретацией полученных *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей 184 заявленных в GenBank (по состоянию на июнь 2010 г) представителей BLV, представлена в обобщенной табл. 11, фактически отражающей схему ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС в соответствии с филогенетической классификацией возбудителя.

Табл. 11. Схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV в соответствии с филогенетической классификацией

Г	Типовой изолят	GenBank A/N	ПЦР- продукт	ПДРФ-фрагменты (п.н.)					К	N
				<i>Bam</i> HI	<i>Pvu</i> II	<i>Dde</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Hph</i> I (<i>Asu</i> HPI)		
1-й	AL-63	FJ808571	444	316/128	444	444	399/45	224/220	1	57
1-й	AL-2106	FJ808578	444	444	444	444	399/45	224/220	2	37
1-й	Uru38	FM209471	444	444	444	330/114	399/45	224/220	3	3
1-й	VdM	M35239	444	316/128	444	444	399/45	224/181/39	4	1
1-й	Kurdistan	EU266062	444	316/128	444	444	399/45	220/196/28	5	1
2-й	AL-164	FJ808574	444	316/128	280/164	276/168	399/45	224/220	6	35
2-й	ARGSF8	AF485773	444	316/128	280/164	276/168	399/45	444	7	1
2-й	AL-1453	FJ808577	444	316/128	280/164	276/168	444	224/220	8	1
3-й	JPFU	EF065650	444	316/128	444	276/168	399/45	444	9	4
4-й	BG	EF065638	444	444	280/164	276/168	399/45	224/220	10	16
4-й	N10	HM102355	444	444	280/164	168/162/114	399/45	224/220	11	1
4-й	3	U87872	444	444	444	168/162/114	399/45	224/220	12	1
5-й	CRAS-2	EF065636	444	316/128	280/164	276/168	399/45	224/181/39	13	8
5-й	CRLC-1	EF065655	444	316/128	280/164	276/168	444	224/181/39	14	2
6-й	PL-1238	FJ808582	444	316/128	444	276/168	399/45	224/220	15	10
7-й	N28	HM102356	444	316/128	444	276/168	444	224/137/83	16	3
7-й	I2	S83530	444	316/128	444	276/168	444	224/220	17	1
7-й	14	AY515274	444	316/128	444	276/168	444	145/137/83/79	18	1

7-й	30	DQ059417	444	316/128	444	276/168	444	444	19	1
-----	----	----------	-----	---------	-----	---------	-----	-----	----	---

Обозначения: Г – генотип; К – комбинация; N – количество проанализированных представителей BLV с соответствующей комбинацией ПЦР-ПДРФ-профилей, чьи нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена депонированы в базу данных GenBank (по состоянию на июнь 2010 г).

Необходимо подчеркнуть, что рассчитанная нами в результате секвенирования продуктов ПЦР-амплификации точная картина ожидаемых ПДРФ-фрагментов локуса *env*-гена провирусной ДНК изолятов ВЛКРС «N10» и «N28» в дальнейшем была воспроизведена экспериментально.

Так, на рис. 7 видно, что при обработке ПЦР-продукта от изолята провируса BLV «N10» ферментом *Bam*HI, ПДРФ-фрагментов не образуется ввиду отсутствия соответствующего сайта рестрикции в анализируемом локусе *env*-гена; *Pvu*II расщепляет ампликон на 2 фрагмента – 280 и 164 п.н., *Dde*I – на фрагменты 168, 162 и 114 п.н., *Ssp*I – 399 и 45 п.н., *Asu*HPI – 224 и 220 п.н. Полученный ампликон длиной 444 п.н. от изолята провируса BLV «N28» расщепляется эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI на фрагменты длиной 316 и 128 п.н., *Dde*I – 276 и 168 п.н., а рестриктазой *Asu*HPI на 224, 137 и 83 п.н.. Ферменты *Pvu*II и *Ssp*I в данном локусе *env*-гена изолята «N28» ПДРФ-фрагментов не образуют из-за отсутствия соответствующих сайтов рестрикции.

Таким образом, отображенные на рис. 7 комбинации ПЦР-ПДРФ-профилей характерны для 4-го (треки 1.0-1.5) и 7-го (треки 2.0-2.5) генотипов ВЛКРС.

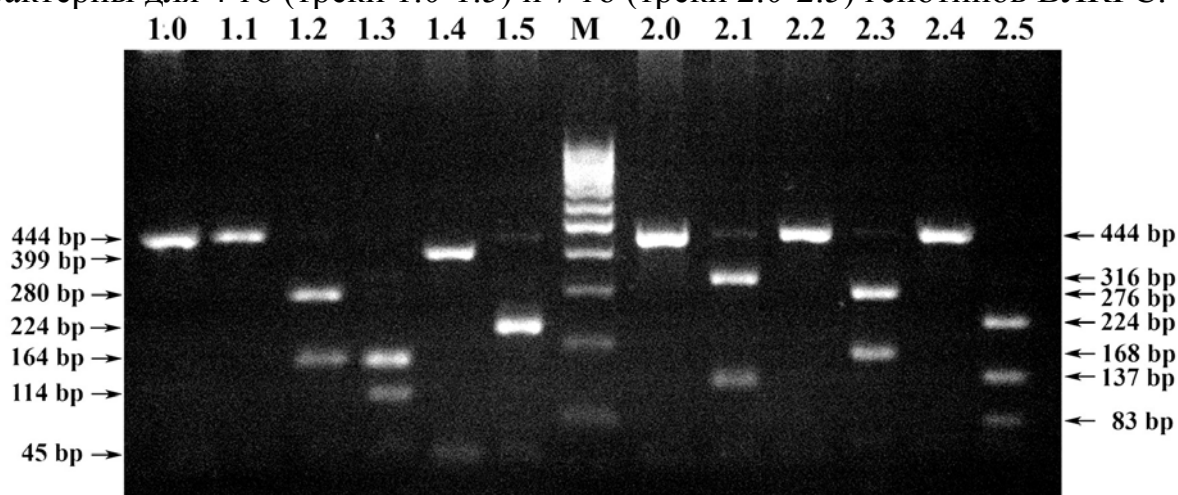


Рис. 7. Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей изолятов провируса BLV «N10» и «N28» (предложенная схема генотипирования ВЛКРС)

Обозначения: 1.0-1.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N10»: 1.0) ПЦР-продукт (444 bp); 1.1) *Bam*HI-ПДРФ (444 bp); 1.2) *Pvu*II-ПДРФ (280/164 bp); 1.3) *Dde*I-ПДРФ (168/162/114 bp); 1.4) *Ssp*I-ПДРФ (399/45 bp); 1.5) *Asu*HPI-ПДРФ (224/220 bp). М) ДНК-маркеры 100-1000 bp (СибЭнзим). 2.0-2.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N28»: 2.0) ПЦР-продукт (444 bp); 2.1) *Bam*HI-ПДРФ (316/128 bp); 2.2) *Pvu*II-ПДРФ (444 bp); 2.3) *Dde*I-ПДРФ (276/168 bp); 2.4) *Ssp*I-ПДРФ (444 bp); 2.5) *Asu*HPI-ПДРФ (224/137/83 bp).

На втором временном этапе работы, в рамках разрабатываемой схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV, согласующейся с филогенетической классификацией, количество проанализированных по нуклеотидным последовательности локуса *env*-гена представителей ВЛКРС, депонированных в базу данных GenBank, по состоянию на апрель 2011 г составляло 210, в число которых входили помимо 2-х ранее выявленных нами изолятов «N10»

(GenBank A/N: HM102355) и «N28» (GenBank A/N: HM102356), еще 2 изолята провируса BLV – «N72» (GenBank A/N: JF683619) и «N174» (GenBank A/N: JF713455), оба выявленных в Дрожжановском районе Республики Татарстан.

Так, было определено, что изолят провируса BLV «N72», первоначально идентифицированный на уровне разрабатываемой схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования как представитель 4-го генотипа ВЛКРС (рис. 8, треки 1.0-1.5), по результатам сравнительного филогенетического анализа секвенированной последовательности локуса *env*-гена (GenBank A/N: JF683619), продолжал соответствовать ранее установленной генотипической принадлежности.

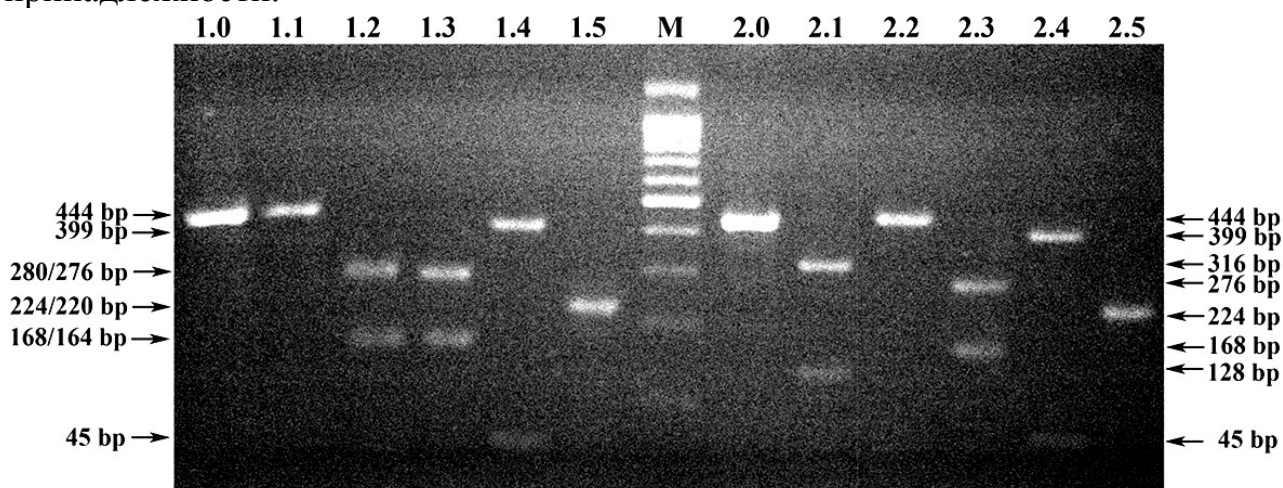


Рис. 8. Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей изолятов провируса BLV «N72» и «N174» (предложенная схема генотипирования ВЛКРС)

Обозначения: 1.0-1.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N72»: 1.0) ПЦР-продукт (444 bp); 1.1) *Bam*HI-ПДРФ (444 bp); 1.2) *Pvu*II-ПДРФ (280/164 bp); 1.3) *Dde*I-ПДРФ (276/168 bp); 1.4) *Ssp*I-ПДРФ (399/45 bp); 1.5) *Asu*HPI-ПДРФ (224/220 bp). М) ДНК-маркеры 100-1500 bp (СибЭнзим). 2.0-2.5) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N174»: 2.0) ПЦР-продукт (444 bp); 2.1) *Bam*HI-ПДРФ (316/128 bp); 2.2) *Pvu*II-ПДРФ (444 bp); 2.3) *Dde*I-ПДРФ (276/168 bp); 2.4) *Ssp*I-ПДРФ (399/45 bp); 2.5) *Asu*HPI-ПДРФ (224/220 bp).

А изолят провируса BLV «N174», первоначально идентифицированный на уровне разрабатываемой схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования как представитель 6-го генотипа ВЛКРС (рис. 8, треки 2.0-2.5), по результатам сравнительного филогенетического анализа секвенированной последовательности локуса *env*-гена (GenBank A/N: JF713455), характеризовался признаком нового, ранее не обоснованного генотипа BLV, обозначенного нами «8-й генотип», ввиду формирования на выстраиваемых дендрограммах нового автономного генотипического кластера, в который также входили изученные другими исследователями близкородственные изоляты, выявленные в Украине [«4-1» (GenBank A/N: HM563766); «3-41» (GenBank A/N: HM563767)] и Хорватии [«M1/ELG_Cro/08» (GenBank A/N: GU724606)].

Таким образом, достоверно установлено, что предложенная нами на первом временном этапе схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования с подобранными

условиями идентификации 7-ми генотипов ВЛКРС по 5 эндонуклеазам рестрикции [*Bam*HI, *Pvu*II, *Dde*I, *Ssp*I и *Hph*I (*Asu*HPI)], не позволяет дискриминировать новый 8-й генотип от 6-го генотипа ВЛКРС.

Необходимо подчеркнуть, что изоляты охарактеризованного нами нового 8-го генотипа ВЛКРС не были проанализированы в работах S.M. Rodriguez et al (2009) и G. Moratorio et al. (2010), так как их нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена были депонированы в базу данных GenBank после выхода статей (S.M. Rodriguez et al., 2009; G. Moratorio et al., 2010) указанных авторов.

С учетом новых знаний о генетическом многообразии BLV, нами была продолжена работа по совершенствованию схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС, согласующейся с филогенетической классификацией, в результате которой были подобраны условия идентификации 8-ми генотипов ВЛКРС по 6 эндонуклеазам рестрикции: *Bam*HI, *Pvu*II, *Dde*I, *Ssp*I, *Hph*I (изошизомер *Asu*HPI) и *Hae*III.

Дополнительно введенный в протокол ПЦР-ПДРФ-генотипирования шестой фермент *Hae*III расщепляет ПЦР-продукт, амплифицированный от провирусной ДНК изолятов 8-го генотипа BLV, на характерные только для них ПДРФ-фрагменты (225/94/87/32/6 п.н.) что позволило в дальнейшем проводить корректную процедуру генотипической идентификации ВЛКРС.

Информация с интерпретацией полученных *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей 210 заявленных в GenBank (по состоянию на апрель 2011 г) представителей BLV представлена в обобщенной табл. 12, фактически отражающей усовершенствованную схему ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС в соответствии с филогенетической классификацией изучаемого инфекционного агента.

Так, 1-ый генотип BLV характеризуется наличием восьми комбинаций *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей (K1-8), 2-ой генотип – четырех комбинаций (K9-12), 3-ий генотип – наличием двух комбинаций (K12-14); 4-ый генотип – трех комбинаций (K15-17); 5-ый генотип – трех комбинаций (K18-20); 6-ой генотип – двух комбинаций (K21-22), 7-ой генотип – четырех комбинаций (K23-26) и 8 генотип ВЛКРС – наличием одной комбинации (K27) *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей BLV (табл. 12).

Примечательно, что для идентификации 1-го генотипа ВЛКРС достаточно даже одной эндонуклеазы рестрикции – *Dde*I. Охарактеризованный в нашей работе новый, ранее не обоснованный 8-ой генотип ВЛКРС также может быть идентифицирован с использованием одной единственной рестриктазы – *Hae*III. С применением двух ферментов могут быть определены представители 4-го [*Bam*HI и *Dde*I], 5-го [*Pvu*II и *Hph*I (*Asu*HPI)] и 7-го генотипов [*Pvu*II и *Ssp*I] BLV (табл. 12).

В целях же исчерпывающей идентификации генотипов ВЛКРС целесообразно руководствоваться полной картиной *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей с сопоставлением полученных данных с результатами секвенирования ПЦР-продуктов и последующим филогенетическим анализом представителей BLV по *env*-гену данного возбудителя.

Табл. 12. Новая схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV в соответствии с филогенетической классификацией

Г	Типовой изолят	GenBank A/N	ПЦР- продукт (п.н.)	ПДРФ-фрагменты (п.н.)						К	N
				<i>Bam</i> HI	<i>Pvu</i> II	<i>Dde</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Hph</i> I (<i>Asu</i> HPI)	<i>Hae</i> III		
1-й	AL-63	FJ808571	444	316/128	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	1	48
1-й	Cow 527	AF007764	444	316/128	444	444	399/45	224/220	285/94/32/27/6	2	8
1-й	23	U87873	444	316/128	444	444	399/45	224/220	312/94/32/6	3	1
1-й	AL-2106	FJ808578	444	444	444	444	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	4	36
1-й	UruC06II	FM955558	444	444	444	444	399/45	224/220	285/94/32/27/6	5	1
1-й	Uru38	FM209471	444	444	444	330/114	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	6	3
1-й	VdM	M35239	444	316/128	444	444	399/45	224/181/39	198/94/87/32/27/6	7	1
1-й	Kurdistan	EU266062	444	316/128	444	444	399/45	220/196/28	198/119/94/27/6	8	1
2-й	AL-164	FJ808574	444	316/128	280/164	276/168	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	9	34
2-й	PL-4960	FJ808590	444	316/128	280/164	276/168	399/45	224/220	198/87/49/45/32/27/6	10	1
2-й	ARGSF8	AF485773	444	316/128	280/164	276/168	399/45	444	198/94/87/32/27/6	11	1
2-й	AL-1453	FJ808577	444	316/128	280/164	276/168	444	224/220	198/94/87/32/27/6	12	1
3-й	JPFU	EF065650	444	316/128	444	276/168	399/45	444	285/94/32/27/6	13	3
3-й	USCA-1	EF065647	444	316/128	444	276/168	399/45	444	285/94/32/21/6/6	14	1
4-й	N72	JF683619	444	444	280/164	276/168	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	15	24
4-й	N10	HM102355	444	444	280/164	168/162/114	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	16	1
4-й	3	U87872	444	444	444	168/162/114	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	17	1
5-й	CRAS-2	EF065636	444	316/128	280/164	276/168	399/45	224/181/39	198/94/87/32/27/6	18	7
5-й	CRGC	EF065639	444	316/128	280/164	276/168	399/45	224/181/39	285/94/32/27/6	19	1
5-й	CRLC-1	EF065655	444	316/128	280/164	276/168	444	224/181/39	198/94/87/32/27/6	20	2
6-й	PL-1238	FJ808582	444	316/128	444	276/168	399/45	224/220	285/94/32/27/6	21	3
6-й	151	AY185360	444	316/128	444	276/168	399/45	224/220	198/94/87/32/27/6	22	7
7-й	N28	HM102356	444	316/128	444	276/168	444	224/137/83	198/94/87/32/27/6	23	17
7-й	I2	S83530	444	316/128	444	276/168	444	224/220	285/94/32/27/6	24	1
7-й	14	AY515274	444	316/128	444	276/168	444	145/137/83/79	198/94/87/32/27/6	25	1
7-й	30	DQ059417	444	316/128	444	276/168	444	444	198/87/49/45/32/27/6	26	1
8-й	N174	JF713455	444	316/128	444	276/168	399/45	224/220	225/94/87/32/6	27	4

Обозначения: Г – генотип; К – комбинация; N – количество проанализированных изолятов BLV с соответствующей комбинацией ПЦР-ПДРФ-профилей, чьи нуклеотидные последовательности локуса *env*-гена депонированы в базу данных GenBank (по состоянию на апрель 2011 г).

ВЫВОДЫ

1. Эпизоотическая ситуация по лейкозу крупного рогатого скота в Республике Татарстан характеризуется как эндемичная. Степень инфицированности стада в разрезе районов РТ за 2010 год варьировала в пределах 0,1-53,7%, со средним значением 16% РИД-позитивных животных от общего числа происследованного поголовья скота Республики Татарстан.

2. В популяциях крупного рогатого скота Республики Татарстан циркулируют изоляты ВЛКРС, идентифицированные в зависимости от выбранной стратегии типизации BLV на основе интерпретации *env*-ПЦР-ПДРФ-профилей как представители Бельгийской и Австралийской подгрупп; 6-го, 1-го и не классифицированного генотипов; вариантных групп «А», «С» и «Е» ВЛКРС; а на основе интерпретации результатов филогенетического анализа секвенированных последовательностей локуса *env*-гена как представители 4-го, 7-го и нового, ранее не обоснованного 8-го генотипов ВЛКРС, соответственно.

3. По результатам сравнительной оценки 210 заявленных в GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей локуса *env*-гена представителей ВЛКРС на предмет их классификации в зависимости от выбранной стратегии идентификации установлено, что известные ранее способы типизации, разработанные на основе ПЦР-ПДРФ-анализа, не согласуются с позже предложенной филогенетической классификацией данного инфекционного агента.

4. Разработанная нами схема ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС с подобранными условиями идентификации 8-ми генотипов BLV по 6 эндонуклеазам рестрикции согласована с современным подходом к оценке его генотипического разнообразия, основанным на филогенетическом анализе *env*-гена возбудителя.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Внедрить в систему мониторинга эпизоотической ситуации по лейкозу крупного рогатого скота молекулярно-генетические способы оценки генотипического разнообразия BLV, включая предложенную нами схему ПЦР-ПДРФ-генотипирования ВЛКРС, согласующуюся с современной филогенетической классификацией данного возбудителя.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах,
рекомендованных ВАК РФ

- 1) Шаева, А.Ю. Генотипирование вируса лейкоза крупного рогатого скота / А.Ю. Шаева, Н.З. Хазипов, Ф.Ф. Зиннатов, Б.В. Камалов // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - Санкт-Петербург, 2009. – № 4. – С. 97-98.
- 2) Шаева, А.Ю. Молекулярно-генетический анализ вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) / А.Ю. Шаева // Ученые записки КГАВМ, Казань. – 2009. – Т. 196. – С. 319-323.
- 3) Шаева, А.Ю. Молекулярно-генетические аспекты типизации вируса лейкоза крупного рогатого скота / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов, А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2011. – Т. 205. – С 226-232.
- 4) Шаева, А.Ю. Разработка схемы ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV в соответствии с филогенетической классификацией / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов, А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2011. – Т. 205. – С 232-237.
- 5) Вафин Р.Р. Генотипирование вируса лейкоза крупного рогатого скота по env-гену / Р.Р. Вафин, М.Ш. Тагиров, А.Ю. Шаева, Н.З. Хазипов, А.М. Алимов, Б.В. Камалов // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2011. - №2. – С. 62-63.
- 6) Шаева, А.Ю. Генотипическая идентификация изолятов ВЛКРС, выявленных в хозяйствах Республики Татарстан / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов, А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ученые записки КГАВМ. – Казань, 2011. – Т. 208. – С. 330-337.

Публикации в материалах конференций,
научных и научно-практических журналах и изданиях

- 7) Шаева, А.Ю. ПДРФ-анализ вируса лейкоза крупного рогатого скота / А.Ю. Шаева // Материалы научно-практической конференции «Становление и достижения биохимической школы Казанского университета. – Казань, 2009. – С. 173-175.
- 8) Шаева, А.Ю. Генотипирование Bovine leukemia virus / А.Ю. Шаева, Н.З. Хазипов, Р.Р. Вафин, Б.В. Камалов, А.М. Алимов // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика -2010». – Москва, 2010. – С. 192-195.
- 9) Шаева, А.Ю. Идентификация изолятов ВЛКРС, выделенных в Республике Татарстан / А.Ю. Шаева // Сборник статей: Ветеринарная медицина домашних животных. – Казань, 2010. – Вып.7. – С. 294-299.
- 10) Шаева, А.Ю. Определение таксономической принадлежности изолятов ВЛКРС, выделенных в РТ / А.Ю. Шаева // Актуальные проблемы развития АПК в научных исследованиях молодых ученых. Труды Всероссийского

совета молодых ученых и специалистов аграрных образовательных и научных учреждений. – Москва: ФГНУ «Росинформагротех», 2011. – Т. 4. – С. 72-78.

- 11) Шаева, А.Ю. Определение генотипической принадлежности изолятов ВЛКРС, выделенных в Республике Татарстан / А.Ю. Шаева, Н.З. Хазипов, Р.Р. Вафин // Инновационные подходы в ветеринарии, биологии и экологии. Материалы международной научно-практических конференций. – Троицк, 2011. – С. 249-254.
- 12) Шаева, А.Ю. Типизация вируса лейкоза крупного рогатого скота / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов, А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ж. Нива Татарстана. – 2011. - №1-2. – С. 49-51.

Публикации в глобальной электронной базе данных GenBank NCBI

- 13) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: HM102355 – Bovine leukemia virus isolate N10 glycoprotein precursor (env) gene, partial cds / Khazipov,N.Z., Shaeva,A.Y., Kamalov,B.V., Alimov,A.M., Zaripov,O.G., Akhmetov,T.M. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2010. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM102355>, свободный.
- 14) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: HM102356 – Bovine leukemia virus isolate N28 glycoprotein precursor (env) gene, partial cds / Khazipov,N.Z., Shaeva,A.Y., Kamalov,B.V., Alimov,A.M., Zaripov,O.G., Akhmetov,T.M. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2010. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HM102356>, свободный.
- 15) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: JF683619 – Bovine leukemia virus isolate N72 glycoprotein precursor (env) gene, partial cds / Shaeva,A.Y., Khazipov,N.Z., Kamalov,B.V., Alimov,A.M., Tagirov,M.S. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2011. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF683619>, свободный.
- 16) National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]: NCBI GenBank (A/N: JF713455 – Bovine leukemia virus isolate N174 glycoprotein precursor (env) gene, partial cds / Shaeva,A.Y., Khazipov,N.Z., Kamalov,B.V., Alimov,A.M., Tagirov,M.S. and Vafin,R.R. – Электрон. дан. – GenBank (NCBI), Bethesda, MD, USA, 2011. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF713455>, свободный.